



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 156 702**

② Número de solicitud: 009900210

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 5/06

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **02.02.1999**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2001**

Fecha de concesión: **27.12.2001**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2002**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.02.2002

⑰ Titular/es: **Universidad de Granada
Acera de San Ildefonso, 42
18071 Granada, ES**

⑱ Inventor/es: **Linares Gil, Ana**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células.**

㉒ Resumen:

Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células. Producción de matrices extracelulares tridimensionales naturales a partir de cultivos de células de músculo liso (SMC) de aves, en las que se induce una aterosclerosis por dieta rica en colesterol, y su preparación para utilizarlas como método eficaz de cultivo de otras células de difícil mantenimiento para la producción de sustancias específicas y de tejidos para la reparación de lesiones. Estas matrices tridimensionales naturales aumentan la eficiencia y productividad del cultivo al aumentar la densidad de células viables y la duración del mismo, además reduce costes al incrementar el volumen de cultivo y al usar una menor cantidad de suero.

ES 2 156 702 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

DESCRIPCION

Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células.

Estado de la técnica

Muchas de las técnicas más actuales de la biotecnología utilizan a la célula como producto en sí mismo como por ejemplo producción de piel artificial, cardiomiocitos para suministrar en infartos de miocardio, órganos artificiales, ensayo de fármacos, test de toxicidad, terapia génica, etc., requieren de forma vital algo tan básico como la mejora en el sistema de cultivo de células, de forma que su productividad sea más alta y óptima reduciendo costes. El colágeno es ampliamente utilizado en este sentido ya sea en forma de redes, "sandwich" o microsferas para sistemas de células inmovilizadas o formando parte de matrices tridimensionales artificiales. Numerosos experimentos han demostrado que las células necesitan una biomatriz apropiada o "andamiaje" como soporte óptimo celular para desarrollar in vitro su fenotipo típico diferenciado. La matriz extracelular tiene un profundo efecto en el comportamiento celular incluyendo migración celular, proliferación y diferenciación (Risau, W., P. Gautschi Sova, and P. Bohlen. *EMBO J* 7:959-962, 1988; Carey D.J., 1991, *Annu. Rev. Physiol.* 53: 161177). Tejidos humanos formados in vitro pueden ser aplicados para desarrollar avanzados modelos de enfermedades (Schmalz G, Garhammer P, Schweiki H (1996) *J Endodontics* 21::249-252.; Service RF (1995) *Science* 270:230-232) o para su utilización en implantes en todos los campos de la cirugía (Sittinger M, Bujia J, Hammer C, Minuth WW, Burmester GR (1994a) *Biomaterials* 15:451-456; Sittinger RF, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR (1996a) *Biomaterials* 17:237:242). En el futuro, el campo de la investigación de biomateriales y la ingeniería de tejidos ofrecerá la fascinante posibilidad de formar el tejido de forma extracorporal a partir de cultivo de células (Werb Z, Sympson CJ, Alexander CM, Thomaset N, Lund LR, Mac Auley A, Ashkenas J, Bissell MJ (1996) *Kidney Int* 49:68-74; Wick M, Koebe HG, Schildberg FW (1996) *Int J Artif Organs* 19: 415-421; Wintermantel E, Mayer J, Blum J, Eckert KL, Luscher P, Mathey M (1996) *Biomaterials* 17: 83-91; Minuth WW, Sittinger M, Kloth S (1998) *Cell Tissue Res* 291:1-11). Todo ello requerirá el avance en la tecnología para el cultivo de células animales y en particular de células humanas, el objetivo principal de esta patente va en este sentido, contribuir a la mejora de la adhesión a la superficie ó substrato donde crece un cultivo de células o tejido.

Las SMCs en cultivo producen una variedad de componentes de matrices extracelulares que incluyen varios colágenos, elastinas, laminina, fibronectina y glucosaminoglucanos (Carey D.J., 1991, *Annu. Rev. Physiol.* 53: 161-177), además las SMCs también expresan integrina que sirve como sitios de enlace a la matriz extracelular. Está demostrado que las SMC de la íntima arterial en el proceso aterogénico tienen un fenotipo alterado si se compara con las SMC normales de la media (Kodrer O, Gabbiani G. 1986 *Human. Pathol.* 17: 875880 Mosse P.R., Camp-

bell G.R., Campbell J.H., 1986, *Arteriosclerosis* 6: 664-669) mostrando cambios morfológicos como reducción de miofilamentos, incremento de orgánulos sintéticos celulares tales como Golgi y retículo endoplásmico rugoso y cambios en la matriz extracelular, expresión de factores de crecimiento y composición lipídica (Campbell G.R., Campbell J.H. 1985 *Exp. Mol. Pathol.* 42: 139-162; Gordon D., Schwartz S.M., 1987, *Am. J. Cardiol.* 59: 44-48). En nuestro laboratorio hemos caracterizado un cultivo de células de músculo liso de aorta procedente de un modelo experimental de aterosclerosis temprana en pollo hipercolesterolémico (Carazo A, Alejandro MJ, Diaz R, Rios A, Castillo M, Linares A (1998). *Lipids* 33,2:181-190.). Las células de músculo liso (SMC) de aorta procedentes de estos animales han sido modificadas en el proceso aterogénico por dieta de colesterol de forma que además de ser desdiferenciadas y proliferativas, producen en cultivo una gran cantidad de matriz extracelular rica en colágeno y elastina. Lo que en principio para nuestro trabajo de investigación no era más que un subproducto que hacía necesario el uso de colagenasa y elastasa además de la tripsina para el despegue de las células cuando el cultivo tiene una duración de 20 días o más, ha resultado ser una matriz tridimensional ideal para el cultivo de otras células con alto rendimiento ya que favorece de forma extraordinaria la adhesión al ser un substrato de composición y estructura natural y por lo tanto aumenta considerablemente la eficiencia y productividad del cultivo.

Tanto si el cultivo de células se obtiene directamente a partir de tejidos animales como si se obtiene a partir de una colección de cultivos, uno de los principales requerimientos de un cultivo de células animales es el anclaje a un substrato sólido para su posterior crecimiento. La interacción entre la membrana celular y la superficie de crecimiento es crítica e involucra una combinación de atracciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals. La adhesión celular ocurre por cationes divalentes (normalmente calcio) y proteínas básicas que forman una capa entre el substrato sólido y la superficie celular. En la mayoría de los casos la interacción célula-superficie está mediada por glucoproteínas contenidas en el suero (como la fibronectina) que provee una capa de 2.5 nm que cubre el substrato sólido y conduce a la adhesión celular. Las células en cultivo también liberan al medio factores que ayudan a formar enlaces entre la superficie de glucoproteínas y el substrato. Una matriz extracelular natural como la formada por las SMC modificadas de aorta de pollo, compuesta en su mayor parte por colágeno, elastina, laminina, fibronectina y glucosaminoglucanos puede ofrecer la posibilidad de cultivar las células con una cantidad mínima de suero, lo que supone un gran ahorro en el cultivo.

La densidad de carga electrostática en el substrato sólido es crítica para optimizar la adhesión celular. Los frascos de cultivo de plástico son de poliestireno sulfonatado con una carga en la superficie de 2-5 grupos cargados negativamente por nm², sin embargo para muchos tipos de células como por ejemplo células de riñón o hepatocitos esto no es suficiente y para mantener la polaridad

necesaria en relación a la adhesión es esencial la utilización de colágeno (Zuk A, Martin KS, Hay ED (1998) *J Cell Biol* 108:903-919; Takeshita K, Bowen WC, Michalopoulos GK (1998) *In Vitro Cell Dev Biol* 34:482-485. El colágeno es ampliamente utilizado en este sentido ya sea en forma de redes, "sandwich" o microesferas para sistemas de células inmovilizadas (Adachi Y, Mio T, Takigawa K, Striz H, Romberger DJ, Spurzem JR, Rennard SI (1998) *In Vitro Cell Dev Biol* 34:203-210; Kino Y, Sawa M, Kasai S, Mito M (1998) *In Vitro Cell Dev Biol* 79:71-76; Tarpila E, Ghassemifar RM, Frazen L (1998) *In Vitro Cell Dev Biol* 34:610-615). Existen también patentes sobre la obtención de matrices artificiales de colágeno para diferentes propósitos tanto relativos a cultivos de células en general y cultivo de tejidos para reparación en cirugía como al suministro de agentes terapéuticos bioreactivos (patentes n° AU5920398; US5817764; US5785964; W09703186; US5405772; CA2223427), pero ninguna de ellas se ha producido de forma natural por un cultivo de células, lo que supone, aún en el caso de ofrecer variaciones en el colágeno por modificación química o cambio de carga neta, mucho mayor simplicidad de composición de las matrices además de las dificultades para su formación. A pesar de todo las matrices de colágeno son ampliamente utilizadas por la imposibilidad de cultivo de muchos tipos de células si no es en substratos de matrices tridimensionales.

Las ventajas que ofrecen las matrices extracelulares segregadas por células en cultivo son claras ya que una mayor complejidad en cuanto a composición y estructura tridimensional de las matrices posibilita una mayor semejanza a un tejido por su síntesis de forma natural. Un ejemplo de matrices naturales son las membranas basales producidas por células tumorales murinas EHS que son preparadas como método de cultivo de células de difícil crecimiento (patente n° US5354666). La célula muscular lisa (SMC) arterial oportunamente modificada tiene la propiedad de sintetizar abundante colágeno y elastina y consiguientemente se atribuye a estas células un papel trascendente en los procesos de esclerosis vascular. La producción de colágeno y elastina por cultivos de SMC de diferentes orígenes ha sido previamente estudiada (Franzblau C., Farris B. (1982) *Methods in Enzymology*; 82:615-635; Bergethon P.R., Mogayzel P.J., Franzblau C. (1989). *Biochem.J.*; 258:279-284; Carver W., Nagpal M.L., Nachtigal M., Borg T.K., Terracio L. (1991) *Circulation Res.*; 69:116-122). La matriz extracelular producida por cultivos de SMC de rata ha sido utilizada para el estudio de la adhesión de monocitos como mecanismo importante en la aterogénesis (Kaufmann J., Jorgensen R.W., Martin B.M., Franzblau C. (1990) *Atherosclerosis*; 85:113-125) y para el estudio de la digestión de matriz extracelular por parte de macrófagos activados, mecanismo importante en muchas condiciones normales y patológicas tales como remodelación de tejidos, cicatrización de heridas e invasión tumoral (Jones P.A., Scott-Burden T. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 86:71-77).

Sin embargo, lo que distingue a esta patente

de los trabajos previamente publicados es la producción de matrices extracelulares por cultivos de SMC de aves con aterosclerosis experimental, circunstancia ésta en la que las matrices extracelulares producidas resultan ser más complejas y abundantes; así como la preparación de estas matrices libres de células para el cultivo de otros muchos tipos de células animales y humanas o cultivo de tejidos de forma que sea viable su comercialización y aplicación a la mejora de los cultivos de difícil mantenimiento aumentando su eficacia y productividad.

Descripción de la invención

Base de la invención

Esta invención es relativa al cultivo de células animales y humanas.

Las matrices tridimensionales de colágeno artificiales son utilizadas para el cultivo de muchos tipos de células. Las ventajas que ofrecen las matrices extracelulares segregadas por células en cultivo son la mayor complejidad en cuanto a composición y estructura tridimensional nativa de las matrices posibilitando una mayor semejanza a un tejido natural, además de la facilidad de su formación ya que están sintetizadas por células en cultivo.

A pesar de la gran necesidad existente de la mejora de los sistemas de cultivos de células en el campo de los biomateriales y la ingeniería de tejidos, todavía se tienen que desarrollar métodos más eficientes para el cultivo de células animales y humanas que tengan el mayor parecido posible al crecimiento "in vivo" manteniendo su fenotipo diferenciado y reduciendo costes.

Descripción de la invención resumida

Un aspecto de esta invención está en relación con la producción de matrices tridimensionales para el cultivo de células. Las matrices comúnmente utilizadas están formadas por colágeno de un modo artificial con las dificultades inherentes al proceso sobre todo en cuanto a las modificaciones químicas de la molécula de colágeno necesarias para lograr una densidad de carga neta positiva o negativa a pH 7, ya que el colágeno es una molécula eléctricamente neutra por lo que sus matrices no ofrecen una cohesión efectiva y en cuanto a las modificaciones químicas necesarias para lograr un grado de entrecruzamiento adecuado por medio de distintos polímeros polianiónicos y agentes productores de enlaces covalentes cruzados. La ventaja fundamental que ofrecen las matrices de esta invención es que son producidas por células de músculo liso de aves hipercolesterolémicas en: cultivo, luego se aprovecha un producto natural cuya; composición y compleja estructura ha sido sintetizada y formada íntegramente por células en cultivo.

Otro aspecto de esta invención es el relativo a la preparación de las matrices extracelulares tridimensionales libres de células. El método incluye los pasos para primero obtener los cultivos de SMC de aves hipercolesterolémicas en las condiciones óptimas para la formación de abundante matriz extracelular (dependiendo de los días y pases del cultivo), segundo el método para liberar el cultivo de las células dejando solo las matrices extracelulares (según el método se puede conseguir además la modificación química de la matriz) y

tercero la conservación de dichas matrices.

También dentro del objetivo de esta invención está el método para el uso de estas matrices preparadas para el cultivo de otras células. El método incluye los pasos de esterilización y preparación de las matrices libres de células para el cultivo de por ejemplo miocardiocitos, hepatocitos, células endoteliales y epiteliales, células pancreáticas etc., junto con la posibilidad de hacer todo tipo de variaciones en los medios de cultivo, utilizando factores de crecimiento que estimulen la proliferación y desarrollo de las distintas células o agentes inductores de la diferenciación celular, etc. Esta manera de producir matrices tridimensionales retiene la estructura nativa de las moléculas que componen la matriz extracelular (colágenos, elastinas, laminina, fibronectina y glucosaminoglucanos); además de la integrina que sirve como enlace a la matriz, extracelular. Las glucoproteínas y fibronectina de la matriz: extracelular están cargadas negativamente, esto favorece la: adhesión de las células que se cultivan en estas matrices, posibilitando la utilización de cantidades reducidas de suero: en el medio. Por todo ello resulta particularmente ventajoso: la utilización de estas matrices tridimensionales para hacer: crecer tanto un cultivo de células homogéneo como una mezcla: de células para la bioproducción de tejidos y órganos artificiales.

Descripción de la invención detallada

Las matrices extracelulares son producidas por cultivos de SMC de aves hipercolesterolémicas. Para obtener estas células aves que han sido alimentadas una dieta rica en colesterol son sacrificadas y las SMC se aíslan de las arterias por medio de explantes.

Para obtener los explantes, las arterias se cortan en piezas de pequeño tamaño y se ponen en frascos de cultivo con una pequeña cantidad de medio de cultivo que se compone de Dulbecco's modification of of Eagle's medium (DMEM), mezcla de antibióticos y suero bovino fetal. Los frascos se ponen entonces de pie con el tapón hacia arriba para promover la adherencia del tejido. Los explantes se mantienen en un incubador de CO₂ (5 % de CO₂) a 37°C durante 24 h. Después de ese tiempo se añade más medio para cubrir los explantes, se ponen derechos los frascos y se examinan cada día al microscopio invertido. La mitad del medio se renueva cada 23 días.

Las células que crecen emigrando fuera de los explantes se despegan con 0.05%/0.02% Tripsina/EDTA se centrifugan a 200xg durante 10 min., se resuspenden en medio completo, se cuentan y se siembran en nuevos frascos (primer pase). Después del primer pase, las células se alimentan cada día y se mantienen antes de cada tripsinización y siguientes pases. Para la obtención de las matrices libres de células, estas se siembran en frascos de cultivo y se mantienen en cultivo durante al menos 15 pases (20 días), en ese momento se forman unas complicadas multicapas de células y matrices extracelulares. Los cultivos se lavan entonces 2 veces con solución salina PBS y las células se lisan NH₄OH a temperatura ambiente. Las matrices se lavan entonces con agua destilada hasta que el pH de los lavados es neutro seguido de un lavado con etanol al 70 % y secado

a 37°C.

Estas matrices fueron hidrolizadas en un 25 % por tripsina, en un 45s por elastasa y en un 30 % por colagenasa.

Las matrices pueden conservarse por medio de aire seco, congelación en seco o al vacío en seco.

Según la aplicación que se vaya a hacer el tamaño de las matrices puede variar, utilizando para ello los distintos tipos y tamaños de substratos existentes en el mercado para el cultivo de células animales.

Ejemplo 1

Las matrices extracelulares son producidas por cultivos de SMC de aorta de pollo hipercolesterolémico. Para obtener estas células pollos recién nacidos machos de la raza white legorhn son mantenidos en una cámara con un ciclo de luz diario de 9 h a 21 h, una temperatura controlada de 29-31°C y alimentados *ad libitum* con una dieta suplementada con colesterol al 5% desde su nacimiento hasta los 10 días de edad, disponiendo de agua todo el tiempo.

Tras el tratamiento los pollos son sacrificados y las células de músculo liso de la aorta son aisladas según el siguiente procedimiento: bajo metuculosas condiciones de esterilidad el arco aórtico se pone en solución salina tamponada (PBS) a pH 7.4 a 37°C conteniendo una mezcla de antibióticos compuesta de penicilina (100 u./ml), estreptomina (100 µg/ml) y anfotericina (0.25 µg/ml). La arteria se limpia de sangre, de tejido adiposo y de tejido conectivo. A continuación se abre cortándola longitudinalmente y se incuba en PBS conteniendo colagenasa Tipo II (1 mg/ml) y elastasa Tipo II (0.5 mg/ml) a 37°C durante 30 min. Después de ese tiempo se retiran las venas adventicias y el epitelio y la arteria se lava extensivamente con PBS.

Para obtener los explantes, las arterias se cortan en piezas de tamaño uniforme de 1mm² y se ponen en frascos de cultivo de 75-cm³ con una pequeña cantidad de medio de cultivo (1 ml) que se compone de Dulbecco's modification of of Eagle's medium (DMEM) suplementado con D-glucosa (4.5 g/L), Lglutamato (0.584g/L), mezcla de antibióticos y 20 % (vol/vol) de suero bovino fetal. Los frascos se ponen entonces de pie con el tapón hacia arriba para promover la adherencia del tejido. Los explantes se mantienen en un incubador de CO₂ (5 % de CO₂) a 37°C durante 24 h. Después de ese tiempo se añade más medio (2 ml) para cubrir los explantes, se ponen derechos los frascos y se examinan cada día al microscopio invertido. La mitad del medio se renueva cada 2-3 días.

Las células que crecen emigrando fuera de los explantes se despegan con 0.05%/0.02% Tripsina/EDTA se centrifugan a 200xg durante 10 min. se resuspenden en medio completo, se cuentan y se siembran en nuevos frascos (primer pase). Después del primer pase, las células se alimentan cada día y se mantienen antes de cada tripsinización y siguientes pases. El medio usado para la alimentación de las células después del primer pase es DMEM con 10 % de suero bovino fetal.

Para la obtención de las matrices libres de células, estas se siembran en placas de 35mm

(10^5 /placa) y se mantienen en cultivo durante 15 pases (20 días), en ese momento se forman unas complicadas multicapas de células y matrices extracelulares. Los cultivos se lavan entonces 2 veces con solución salina PBS y las células se lisan en 0.2 M de NH_4OH durante 30min. a temperatura ambiente. Las matrices se lavan entonces con agua destilada hasta que el pH de los lavados es neutro seguido de un lavado con etanol al 70% y secado a 37°C .

Para obtener los explantes, las aortas se cortan en pequeñas piezas y se procede de igual forma que lo descrito en el apartado anterior. Los cultivos de SMC y las matrices extracelulares libres de células se obtienen de igual manera que lo descrito en el apartado anterior.
Ejemplo 2

En la utilización de estas matrices para el cultivo de otras células se procede de la siguiente manera: las matrices se mantienen durante 10 min. en etanol al 70%, se lavan con agua desionizada esteril 3 veces y se dejan bajo luz W durante 2h, entonces se pueden guardar a 4°C durante 3 días. A continuación se introducen en el frasco de cultivo las células que se quieran cultivar con el medio adecuado para cada tipo de célula, factores de crecimiento, agentes inductores de la diferenciación etc., suero bovino fetal 5%. Las placas preparadas con estas matrices pueden usarse para el cultivo de muchos tipos de células, por ejemplo miocardiocitos, hepatocitos, células pancreáticas, células endoteliales y epiteliales, etc., así como la mezcla de células para el cultivo de tejidos y órganos artificiales.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células **caracterizado** por su obtención mediante el cultivo de células de aves y la posterior lisis de dichas células hasta obtener la matriz tridimensional.

2. Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células según reivindicación primera **caracterizado** porque las células son extraídas de músculo liso de aves.

3. Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células según reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque las aves usadas para la extracción del tejido de músculo liso son alimentadas con una dieta rica en colesterol en porcentajes de un 1% a un 15%.

4. Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células según reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque las células de músculo liso son extraídas de arterias de pollos.

5. Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células según reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque el tejido extraído de la arteria se pone en una solución salina tamponada conteniendo antibióticos.

6. Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células según reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque los antibióticos adicionados a la solución salina tamponada son penicilina, estreptomina y anfotericina en cualquier proporción y dosificación.

7. Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células según reivindicaciones anteriores **caracterizado**

porque la incubación del tejido tiene lugar en colagenasa tipo I y colagenasa tipo II en cualquier proporción, dosificación y tiempo.

8. Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células según reivindicaciones anteriores **caracterizado** por el cultivo de explantes del tejido en un medio de cultivo compuesto de DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium) solo o mezclado.

9. Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células según reivindicaciones anteriores **caracterizado** por la adición al medio DMEM de D-glucosa, L-glutamato, antibióticos y suero de mamífero en cualquier dosificación y proporción.

10. Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células según reivindicaciones anteriores **caracterizado** por la utilización de Tripsina/EDTA para desprender las células que migran fuera de los explantes.

11. Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células según reivindicaciones anteriores **caracterizado** por la siembra de dichas células en frascos de cultivo de cualquier tipo y mantenimiento en cultivo durante 5 a 50 pases.

12. Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células según reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque las células son lisadas con reactivos de pH básico.

13. Método para la producción de matrices tridimensionales naturales para cultivo de células según reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado** por producir matrices de distinto tamaño dependiendo del substrato utilizado para cultivarlas.

14. Uso del método reivindicado anteriormente para el cultivo de cualquier tipo de célula animal o mezcla de ellas.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 5/06

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9621003 A (UNIVERSITÉ LAVAL) 11.07.1996, todo el documento.	1
A	NESTA, D. Identification of a variant collagen alpha 3 (VI) in early-stage avian arteriosclerotic plaques. Atherosclerosis. 20.01.1995, Vol. 112, N° 2, páginas 197-212. (resumen) MEDLINE[en línea][recuperado el 21.05.2001]. Recuperado de STN International, Columbus, Ohio (EEUU) N° de acceso: 95-290029.	1
A	COLOMBATTI, A. The elastin associated glycoprotein gp115. Synthesis and secretion by chick cells in culture. J. Biol. Chem., 1988, Vol. 263, N° 33, páginas 17534-40. (resumen) HCAPLUS[en línea][recuperado el 18.05.2001]. Recuperado de STN Int., Columbus, Ohio, (EEUU) N° de acceso 1988; 587647.	1
A	COLOMBATTI, A. Biosynthesis of Chick type VI collagen II. Processing and secretion in fibroblasts and smooth muscle cells. J. Biol. Chem., 1987, Vol. 262, N° 30, páginas 14461-6. (resumen) HCAPLUS[en línea][Recuperado el 18.05.2001]. Recuperado de STN Int., Columbus, Ohio, (EEUU). N° de acceso: 95-290029.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

29.05.2001

Examinador

L. Serriá Ramírez

Página

1/1